

## 手指から分離した細菌に対する植物抽出液の抗菌効果

小山さくら<sup>1\*</sup>、辻 友美<sup>1\*</sup>、永野 忠聖<sup>1</sup>、田村 朝子<sup>1\*</sup>

植物抽出液の手指用洗浄剤としての可能性を見出すことを目的に、廃棄されることの多いキク葉、フキ葉と、抗菌効果が多く報告されている緑茶を試料として、これら植物抽出液の細菌（手指からの分離菌と食中毒菌）に対する抗菌効果を検討した。

植物抽出液の総ポリフェノール量は、いずれの植物抽出液においても抽出水の温度が高くなる程多くなる傾向にあった。また、手指から分離した細菌は平均して総菌数  $5.1 \times 10^2$  個 ( $\log/\text{ml } 2.2 \pm 0.2$ ) 検出された。グラム陽性球菌では、*Staphylococcus* 属の *S. capitis* が 18 株、*S. warneri* が 1 株、*Aerococcus* 属の *A. urinae* が 2 株同定され、グラム陰性桿菌では、*Serratia* 属の *Se. plymuthica* が 3 株同定された。次に、キク葉、フキ葉、緑茶抽出液を抗菌液とし、手指から分離した細菌 (*S. capitis* 41)、及び食中毒菌の標準株 *E. coli*、*S. aureus*、*S. capitis* S に対して抗菌試験を行った。その結果、ディスク拡散法により、*E. coli*、*S. aureus* に対して菌の生育を阻止するためには、フキ葉、緑茶ともに総ポリフェノール量が 22.0mg/ml 程度は必要であることがわかった。また、*S. capitis* S に対し、フキ葉は 0.44mg/ml、緑茶は 0.22mg/ml の総ポリフェノール量が必要であることがわかった。なお、キク葉は、本研究で使用した供試菌株に対して抗菌効果を示さなかった。希釈平板法では、いずれの菌株に対しても、フキ葉、緑茶ともに増殖抑制効果があることが明らかになった。また、*S. aureus*、*S. capitis* S に対して、フキ葉は 0.47mg/ml、緑茶は 1.0mg/ml 以上で、完全に細菌増殖を抑制できることが明らかになった。一方、ATP 拭き取り検査法により、フキ葉、緑茶の洗浄・消毒効果を検討した結果、ともに飲用濃度、10% 濃度で基準値 1500RLU を下回った。

以上の結果から、フキ葉、緑茶は、飲用濃度抽出液で手指の洗浄剤として活用可能であることが示唆された。しかし、緑茶では正確な ATP 測定が難しいため、ATP 拭き取り検査法以外の細菌培養法などの衛生検査を併用する必要があるといえる。

**キーワード：** フキ葉、緑茶、ポリフェノール、抗菌効果、ATP

### はじめに

特定給食施設における衛生・安全管理の目的は、食中毒などの事故を未然に防止し、かつ安全でおいしい食事を提供すること<sup>1)</sup>にある。食中毒防止を目的として、平成9年に厚生省（現在の厚生労働省）より作成された「大量調理施設衛生管理マニュアル」、平成21年には「学校給食衛生管理基準」が学校給食法の改正とともに整備されている。これらのマニユア

ルでは、HACCP の概念を導入し、食品材料購入から盛り付けに至るまでの重要管理事項をあげ、それらの点検・記録の遂行とともに、改善が必要な場合は適切な措置を講じることが重要<sup>2)</sup>とされている。HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) とは、危害分析重要管理点のそれぞれの頭文字をとったもので、食品製造時の安全衛生に関する危害の発生を事前に防止するための、自主的な衛生管理システム<sup>1)</sup>である。

<sup>1)</sup> 新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科

\* 責任著者 連絡先 :asako-t@unii.ac.jp

\* 小山さくら 辻友美 共同筆頭

利益相反: なし

食中毒による事故は、近年はカンピロバクター食中毒が発生事件数の1位、2位を占め、ノロウイルスによるものは、例年患者数の50%前後を占め圧倒的に発生の多い食中毒となっている。また、平成23、24年には腸管出血性大腸菌食中毒による死亡事例も発生<sup>3)</sup>している。これらの食中毒を引き起こすカンピロバクター、ノロウイルス、腸管出血性大腸菌は、いずれも、ごく微量の菌数やウイルスで発症することが知られている。したがって、食中毒を予防するには3原則である①つけない、②増やさない、③やっつける、の衛生管理を徹底して実施する必要がある。

食中毒の防止において最も重要となるのが手洗いである。給食調理の現場では、調理前、調理途中に何度も手洗いを実施し、調理従事者の手や器具から食材への汚染拡大を防ぐよう努めている。給食施設の衛生管理基準の基である大量調理施設衛生管理マニュアル<sup>2)</sup>には、手洗い方法について「石けんで2回洗浄後、消毒用のアルコールをかけて手指によくすりこむこと」と示されている。仮に保菌者が用便後の手洗いを励行しない場合、食品を汚染するケースが考えられる他、実際に、保菌者の調理従事者の手指から、二次汚染により黄色ブドウ球菌食中毒が発生した事例が報告<sup>4)</sup>されている。したがって、調理作業前の調理従事者の保菌検査と、調理作業中の手洗いを怠ることはできない。

特定給食施設における衛生管理を目的とした手洗いでは、衛生的な手洗いをする必要<sup>5)</sup>がある。衛生的な手洗いで重要となるのは、汚れを落とすだけでなく、一時的に付着汚染している付着菌と黄色ブドウ球菌などの食中毒菌をきちんと洗い流すことである。

このように、手洗いは食中毒の防止につながる重要な行為ではあるが、一方で頻回の手洗いによる問題点も生じている。まずは皮膚への影響があげられ、主に手荒れを引き起こす原因となりうる。また、手荒れは黄色ブドウ球菌と密接な関係にある<sup>6)</sup>との報告がある。これらは食中毒を防止するための手洗いが、逆に食中毒を引き起こす可能性を高める要因となりうることを示している。したがって、手指に手荒れを生じにくくする石けんや洗浄剤が必要とされる。また、他に問題点として環境汚染があげら

れる。手洗いには石けんが用いられるが、洗浄力の担い手であり主成分でもある界面活性剤は、多量な使用が重なると水質を汚染し公害の原因となる。これらの問題を解決するためには、手指の洗浄に界面活性剤のような物質を使用した石けんではなく、カテキン等のような食用可能である植物天然成分を活用すれば、人体や環境にとって、より安全で安心な調理作業が可能になるのではないかと考えられる。

これまでに、茶カテキンが病原性大腸菌に対して増殖抑制を示す<sup>7)</sup>こと、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、ウェルシュ菌などの食中毒菌に対して抗菌活性を示す<sup>8)</sup>ことなど、多くの報告がされている。カテキンはポリフェノール類の一種であり、カテキン以外のポリフェノール類についても、野草抽出物のポリフェノール化合物が*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*に対して生育抑制効果を示す<sup>9)</sup>こと、ウコギ抽出液が食中毒細菌に対して抗菌作用を示し、抗菌効果の主成分がクロロゲン酸などのポリフェノール類と推測された<sup>10)</sup>との報告がある。このことから、カテキン以外のポリフェノール類にも、手指の洗浄・消毒効果が期待できると考えられる。そこで本研究では、新潟の伝統野菜である食用菊と、身近に自生するフキ、及び緑茶からポリフェノール類を抽出して実験試料とし、手指に対する洗浄・消毒効果を検討することとした。

食用菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. forma *esculentum* Makino) は、キク科キク属の多年生草本<sup>11)</sup>である。一般に花びらを食し、葉を食用とすることはない。また、フキ (*Petasites japonicus*) は、キク科フキ属の多年生草本<sup>12)</sup>である。古くより山菜として食されてきたが、日本食品標準成分表2010では、フキ葉は廃棄部位とされている。したがって、廃棄部の有効活用を考え、これらの植物の廃棄部である葉を試料とした。緑茶は、茶類 (*Camellia sinensis*) ツバキ科カメリア属の常緑樹<sup>13)</sup>であり、茶カテキンの抗菌効果が多く報告されている。

本研究では、前述したように、ポリフェノール類を多く含有する、キク葉、フキ葉、緑茶を用い、これらから抽出した溶液の、手指より分

離した細菌及び食中毒菌に対する抗菌試験を行い、植物抽出液の手指用洗剤としての可能性を見出すことを目的に、その洗浄・消毒効果を検討した。

## 方法

### (1) 実験試料の調製

キク葉は、平成 23 年 1 月、新潟県新潟市南区のかきのもと栽培農家から食用菊花を摘採後の葉を譲り受けた。フキ葉は、平成 21 年 11 月に新潟県五泉市内で採取した。緑茶は、市販村上茶（浅川園 平成 24 年産）を購入した。キク葉、フキ葉はそれぞれ採取後すぐに新生バイオ（株）に依頼し、乾燥製粉処理をしたものを試料として用いた。緑茶は市販品をそのままミルサー IFM650D（岩谷産業）で粉末状にしたものを試料とした。

### (2) キク葉、フキ葉、緑茶抽出液の調製

キク葉、フキ葉、緑茶粉末 1.0g にそれぞれ蒸留水 (20℃) を加え、30 分間攪拌抽出し、100ml に定容した。それを濾過したものを水抽出液 (1.0%) とした。湯抽出液 (1.0%) はキク葉、フキ葉、緑茶粉末 1.0g に、それぞれ蒸留水 (80℃) を加え、80℃ の湯浴中で 30 分間攪拌抽出し、100ml に定容した。それを濾過したものを湯抽出液 (1.0%) とした。また、キク葉、フキ葉、緑茶粉末 1.0g に蒸留水 (100℃) 100ml を加え、1 分間攪拌抽出し、濾過したものを沸騰抽出液 (1.0%) として調製した。

### (3) 総ポリフェノール量測定

各植物抽出液中の総ポリフェノール量の測定は、Folin-Denis 法<sup>14-15)</sup>を用いた。すなわち、各抽出液（水、湯、沸騰抽出液）を蒸留水で適宜希釈後、1.0ml 採取し、そこに、フォーリンチオカルト試薬（和光純薬工業）1.0ml を加えて混和し、3 分間静置した。そこに 10% 炭酸ナトリウム溶液（関東化学）1.0ml を加えて全量を 3.0ml とし、60 分間室温暗所で反応させた。これを、分光光度計 (UV mini-1240、島津製作所) を用いて 750nm の吸光度を測定した。なお、標準ポリフェノール試料には、没食子酸（東京化成工業）を用い、その検量線から、各抽出液中の総ポリフェノール量を没食子酸当量で算出した。

抽出液の希釈については、フキ葉抽出液（湯、沸騰抽出液）、緑茶抽出液（水、湯、沸騰抽出液）は 10 倍希釈、キク葉抽出液（水、湯、沸騰抽出液）、フキ葉水抽出液においては原液で測定した。

### (4) 手指からの細菌の分離・同定

平成 25 年 4 月、同意を得た 5 名の学生の手指を滅菌済綿棒でふきとり、これを滅菌生理食塩水 2.0ml に入れて懸濁させた。この懸濁液を細菌分離用試料とした。この試料液 20μl を以下の 3 種類の培地に接種した。接種に用いた培地は、普通寒天培地（肉エキス 5.0g、ペプトン 10.0g、塩化ナトリウム 5.0g、乳糖 10.0g、寒天 15.0g、蒸留水 1L、ニッスイ）、DHL 寒天培地（肉エキス 3.0g、ペプトン 20.0g、乳糖 10.0g、白糖 10.0g、デオキシコール酸ナトリウム 1.0g、クエン酸鉄アンモニウム 1.0g、ニュートラルレッド 0.03g、寒天 15.0g、蒸留水 1L、ニッスイ）、ブドウ球菌培地（酵母エキス 2.5g、ペプトン 10.0g、ゼラチン 30.0g、マンニット 10.0g、塩化ナトリウム 75.0g、乳糖 2.0g、リン酸-水素カリウム 5.0g、寒天 15.0g、蒸留水 1L、ニッスイ）である。接種後、37℃ で 24 時間培養した。培養終了後、各培地上に出現したコロニーを計測し、コロニーの色、形状などを観察後、人の手指あたりの総菌数を算出した。また細菌の同定は、コロニーを鉤菌し、グラム染色、顕微鏡下での形態観察後、API Staph、API 20 Strep、API 20E（シスメックス・バイオメリユー）を用いて生化学検査を行った。

### (5) 分離菌、標準菌に対する抗菌効果の検討

#### 1) 使用菌株

抗菌試験には以下の 4 株菌を使用した。標準菌株の *Escherichia coli* NBRC 102203（以下、*E.coli* とする。）、*Staphylococcus aureus* NBRC 100910（以下、*S.aureus* とする。）、*Staphylococcus capitis subsp.capitis* JCM 2420（以下、*S.capitis* S とする。）3 株と、手指からの分離菌 *Staphylococcus capitis*（以下、*S.capitis* 41 とする。）1 株である。

#### 2) 抗菌試験 ディスク拡散法

抗菌液には、各沸騰抽出液を用い、ロータリーエバポレーター (RE300、ヤマト科学) で減圧濃縮し、各抽出液の総ポリフェノール量が

同濃度になるように調整して使用した。すなわち、キク葉抽出液は 100 倍、フキ葉抽出液は 47.2 倍、また緑茶抽出液は 14.7 倍に減圧濃縮し、総ポリフェノール量 22.0mg/ml (キク葉沸騰抽出液の総ポリフェノール量) に調整したものを抗菌液原液とした。抗菌液の原液を 1 倍 (総ポリフェノール量 22.0mg/ml)、10 倍 (2.20mg/ml)、50 倍 (0.44mg/ml)、100 倍 (0.22mg/ml) に滅菌蒸留水で希釈したものを抗菌液試料として、ディスク拡散法に用いた。

斜面培地上に生育した各菌株に、生理食塩水 20ml を加え、懸濁後、デンストメーター (DENSIMAT ビオメリュー) で McFarland:5.0 に調整した。これを生理食塩水で順次希釈し、供試菌懸濁液  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  を調製した。供試菌懸濁液 ( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ ) 1.0ml をシャーレに接種し、50℃ で加温溶解させた普通寒天培地 15ml を加え、混和し、平板培地を作製した。各抗菌液 50 $\mu$ l を滅菌したディスク ( $\phi$ 6mm 東洋濾紙) に滴下し、これを平板培地上にのせ、37℃ で 24 時間培養した。培養終了後、ディスク周囲に出現した阻止円の直径を測定した。

### 3) 抗菌試験 希釈平板法

抗菌液には、フキ葉、緑茶の沸騰抽出液を用い、ロータリーエバポレーター (RE300、ヤマト科学) で減圧濃縮し、各抽出液の総ポリフェノール量を 10mg/ml に調整したもの (1.0% 抗菌液培地または 10.0% 抗菌液培地に使用)、また、各抽出液を 10 倍に減圧濃縮したもの (飲用濃度抗菌液培地に使用) を抗菌液試料として用いた。

斜面培地上に生育した各菌株に、生理食塩水 10ml を加え、懸濁後、デンストメーター (DENSIMAT ビオメリュー) で McFarland:5.0 に調整した。これを生理食塩水で順次希釈し、供試菌懸濁液  $10^{-5}$  を調製した。シャーレに、50℃ で加温溶解させた普通寒天培地と抗菌液試料を混和し、全量 10ml となるよう抗菌液培地を作成した。抗菌液培地に供試菌懸濁液 ( $10^{-5}$ ) 0.1ml を接種し、37℃ で 24 時間培養した。抗菌液培地の組成については、0% 濃度抗菌液培地 (総ポリフェノール量 0.0mg/ml) : 普通寒天培地 10.0ml、1.0% 濃度抗菌液培地 (総ポリフェノール量 0.1mg/ml) : 普通寒天培地 9.9ml+10mg/

ml 抗菌液試料 0.1ml、10.0% 濃度抗菌液培地 (総ポリフェノール量 1.0mg/ml) : 普通寒天培地 9.0ml+10mg/ml 抗菌液試料 1.0ml、飲用濃度抗菌液培地 (総ポリフェノール量 フキ葉 0.47mg/ml、緑茶 1.50mg/ml) : 普通寒天培地 9.0ml+10 倍濃縮抗菌液試料 1.0ml、に配合した。培養終了後、培地に出現したコロニーを計測し、以下の式を用いて増殖抑制率 (%) を算出した。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = \frac{0\% \text{抗菌液培地のコロニー数} - \text{各抗菌液培地のコロニー数}}{\text{各抗菌液培地のコロニー数}} \times 100$$

### (6) 手指に対する洗浄・消毒効果

各抽出液の手指に対する洗浄・消毒効果を検討するため、ルミテスター PD-10N (キッコーマン) を用い、ATP 拭き取り検査法で手指の ATP 測定を行った。試料液には、(5) 3) の抗菌試験で、抗菌効果の高かった 10% 濃度抗菌液 (フキ葉、緑茶)、飲用濃度抗菌液 (フキ葉、緑茶) の 4 種類を洗浄試料液として用いた。試料液による手指の洗浄・消毒方法は、各試料液に手指を浸漬し、試料液中で 30 秒間手洗いを行い、流水ですすぐ工程を 2 回行った。また、対照の洗浄方法として、大量調理施設衛生管理マニュアルに示された方法を常法 (石けんで洗浄後、流水ですすぐ工程を 2 回行った。) とした。なお、石けんには、特定給食施設で手洗いに使用されている殺菌・消毒用手洗い石鹸液「シャボネット<sup>®</sup> 石鹸液 (サラヤ)」を用いた。洗浄前後の手指の ATP 量を測定し、残存 ATP 量と ATP 減少率 (%) を求めた。なお、ATP 減少率 (%) は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{ATP 減少率 (\%)} = \frac{\text{洗浄前の ATP 量 (RLU)} - \text{洗浄後の ATP 量 (RLU)}}{\text{洗浄前の ATP 量 (RLU)}} \times 100$$

### (7) 統計処理

実験結果は、平均値  $\pm$  標準誤差で表した。統計処理は、SPSS (PASW Statistics17.0) を用い、一元配置分散分析を行った後、Bonferroni の多重比較検定により、各データの有意差検定を行った。なお、 $p < 0.05$  のものを危険率 5% で統計的に有意とした。

## 結果と考察

### (1) 総ポリフェノール量

表1 抽出法の違いによる総ポリフェノール量の比較

		(mg/100ml)		
		水抽出	湯抽出	沸騰抽出
キク葉	1.0%	13.8 ± 0.03 <sup>c</sup>	18.9 ± 0.14 <sup>b</sup>	22.1 ± 0.35 <sup>a</sup>
フキ葉	1.0%	27.2 ± 0.20 <sup>b</sup>	21.6 ± 0.74 <sup>c</sup>	46.8 ± 1.61 <sup>a</sup>
緑茶	1.0%	65.8 ± 1.82 <sup>c</sup>	71.9 ± 0.70 <sup>b</sup>	150.5 ± 1.00 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup>;各植物試料において、異なる抽出方法の間で異なる文字は有意差を意味する( $p < 0.05$ )

表2 手指からの細菌の同定

表2-1 API Staph

同定細菌(グラム陽性菌)	形状	グラム染色	MAN <sup>1)</sup>	ADH <sup>2)</sup>	TRE <sup>3)</sup>	SAC <sup>4)</sup>	NIT <sup>5)</sup>	MAL <sup>6)</sup>	FRU <sup>7)</sup>
<i>Staphylococcus capitis</i> (18株)	球	+	—	+	—	—	+	—	+
	球	+	—	—	—	—	+	—	+
	球	+	—	—	—	—	+	—	+
<i>Staphylococcus warneri</i>	球	+	—	+	+	+	—	+	+

<sup>1)</sup>MAN:D-マンニトールの発酵

<sup>4)</sup>SAC:白糖の酸性化

<sup>7)</sup>FRU:果糖の発酵

<sup>2)</sup>ADH:L-アルギニンの分解

<sup>5)</sup>NIT:硝酸塩の亜硝酸塩への還元

<sup>3)</sup>TRE:D-トレハロースの発酵

<sup>6)</sup>MAL:マルトースの発酵

表2-2 API 20 Strep

同定細菌(グラム陽性菌)	形状	グラム染色	MAN	ADH	TRE	SOR <sup>8)</sup>	ARA <sup>9)</sup>	βGUR <sup>10)</sup>	INU <sup>11)</sup>
<i>Aerococcus urinae</i> (2株)	球	+	—	—	+	—	—	+	—
	球	+	—	—	+	—	—	—	+

<sup>8)</sup>SOR:D-ソルビトールの発酵

<sup>10)</sup>βGUR:ナフトール-AS-BI β-D-グルクロン酸の分解

<sup>9)</sup>ARA:L-アラビノースの発酵

<sup>11)</sup>INU:イヌリンの発酵

表2-3 API 20E

同定細菌(グラム陰性菌)	形状	グラム染色	MAN	ADH	LDC <sup>12)</sup>	GLU <sup>13)</sup>	SAC	SOR	ARA
<i>Serratia plymuthica</i> (3株)	桿	-	+	—	—	+	+	+	+

<sup>12)</sup>LDC:塩酸リジンの分解

<sup>13)</sup>GLU:グルコースの発酵

キク葉、フキ葉、緑茶抽出液中の総ポリフェノール量の定量結果を、表1に没食子酸当量で示した。

その結果、全ての植物抽出液において、沸騰抽出が有意に高くなった。キク葉、緑茶抽出液においては水抽出、湯抽出、沸騰抽出の順に、フキ葉抽出液は、湯抽出、水抽出、沸騰抽出の順に抽出されるポリフェノール量が多くなった。このことから、抽出液の温度が高くなるほど抽出されるポリフェノール量は増加傾向にあったといえる。野草を含むハーブのポリフェノールは、低温抽出に比べ、高温抽出の方が、0.8～1.2倍溶出しやすいという報告<sup>15)</sup>があることから、本研究で用いたキク葉、フキ葉、緑茶においても、最も温度の高い沸騰抽出で、ポリフェノールがより溶出されやすいことが認められた。

また、植物間で比較すると、いずれの抽出温

度においても、緑茶のポリフェノール抽出量が最も多くなった。なお、本研究の以降の抗菌試験、手指の洗浄・消毒効果の検討には、各植物の沸騰抽出液を用いることとした。

## (2) 手指からの細菌の分離・同定

同意を得た5名の手指からは平均して総菌数  $5.1 \times 10^2$  個 ( $\log/\text{ml}$   $2.2 \pm 0.2$ ) の細菌が検出された。この中から特徴的なコロニーを釣菌し、計24株を単離した。単離した菌を、グラム染色、顕微鏡下での形態観察後、生化学実験を行い、同定した。細菌の同定結果を表2に示した。

その結果、グラム陽性球菌では *Staphylococcus* 属の *S. capitis* が18株、*S. warneri* が1株、*Aerococcus* 属の *A. urinae* が2株同定された。グラム陰性桿菌では、*Serratia* 属の *Se. plymuthica* が3株同定された。

最も多く分離・同定された *Staphylococcus capitis* は、表皮ブドウ球菌の一種であり、主

表3 各抗菌液による阻止円の比較

		(mm)			
		供試菌液 $10^{-1}$			
	希釈濃度	$\times 1^{1)}$	$\times 10$	$\times 50$	$\times 100$
<i>E.coli</i>	フキ葉	— <sup>2)</sup>	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	—	—	—	—
<i>S.aureus</i>	フキ葉	6.6 $\pm$ 0.2	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	14.3 $\pm$ 0.4 <sup>*</sup>	—	—	—
<i>S.capitis</i> S	フキ葉	24.0 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	13.7 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	26.3 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	16.0 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	9.4 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	—
<i>S.capitis</i> 41	フキ葉	—	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	—	—	—	—
		供試菌液 $10^{-2}$			
	希釈濃度	$\times 1^{1)}$	$\times 10$	$\times 50$	$\times 100$
<i>E.coli</i>	フキ葉	6.5 $\pm$ 0.3	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	—	—	—	—
<i>S.aureus</i>	フキ葉	9.4 $\pm$ 0.8	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	14.1 $\pm$ 0.6 <sup>*</sup>	—	—	—
<i>S.capitis</i> S	フキ葉	24.6 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	16.8 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	10.0 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	30.2 $\pm$ 1.7 <sup>*a</sup>	18.4 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	12.0 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	10.7 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
<i>S.capitis</i> 41	フキ葉	—	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	7.7 $\pm$ 0.1	—	—	—
		供試菌液 $10^{-3}$			
	希釈濃度	$\times 1^{1)}$	$\times 10$	$\times 50$	$\times 100$
<i>E.coli</i>	フキ葉	8.3 $\pm$ 0.8	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	6.9 $\pm$ 0.1	—	—	—
<i>S.aureus</i>	フキ葉	13.0 $\pm$ 0.6	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	16.4 $\pm$ 0.4 <sup>*</sup>	—	—	—
<i>S.capitis</i> S	フキ葉	25.5 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	14.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	11.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	31.0 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 0.9 <sup>*b</sup>	11.0 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	8.0 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>
<i>S.capitis</i> 41	フキ葉	—	—	—	—
	キク葉	—	—	—	—
	緑茶	7.9 $\pm$ 0.0	—	—	—

a,b,c: 各茶抽出液の各濃度においての有意差を意味する( $p < 0.05$ )\*: 各抗菌液間での有意差を意味する( $p < 0.05$ )1)  $\times 1$ : 抗菌液原液の総ポリフェノール量 22.0mg/ml

2) —: 阻止円なし

・ディスクφ6mm

に頭皮に生息している常在菌である。また、*Serratia* 属は緑膿菌に並ぶ、院内感染菌として知られている。腸内細菌科に分類されるが、ヒトや動物の腸のほかにも、水や土壌など自然環境に広く生息している。以降の抗菌試験には、本研究で最も多く分離・同定された *Staphylococcus capitis* (以下、手指からの分離菌を *S.capitis* 41 とする) とその標準菌 (*S.capitis* S)、食中毒菌への抗菌効果を検討するため、腸管出血性大腸菌食中毒の原因となる *Escherichia coli* (*E.coli*)、黄色ブドウ球菌食中毒の原因と

なる *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) の4菌株を選択し、使用した。

### (3) 分離菌、標準菌に対する抗菌効果

#### 1) 抗菌試験 ディスク拡散法

ディスク拡散法による抗菌試験結果を、表3に示した。なお、表中の数値は、ペーパーディスクの直径が6mmであったことから、阻止円が6mmより大きいものについては、その実測値を示し、6mm以下のものについては、阻止円なしとして「-」で示した。また、抗菌液希釈液の総ポリフェノール量は、原

表 4 各抗菌液による細菌の増殖抑制率

				(%)	
抗菌液培地濃度	フキ葉				
	1%	10%	飲用濃度		
<i>E.coli</i>	19.4 ± 3.0 <sup>b</sup>	93.4 ± 3.0 <sup>a</sup>	30.4 ± 7.6 <sup>b</sup>		
<i>S.aureus</i>	57.0 ± 7.1 <sup>b</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>		
<i>S.capitis</i> S	97.4 ± 1.0 <sup>b</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>		
<i>S.capitis</i> 41	15.2 ± 0.3	34.4 ± 7.4	35.9 ± 5.9		

  

抗菌液培地濃度	緑茶				
	1%	10%	飲用濃度		
<i>E.coli</i>	34.6 ± 5.7	38.8 ± 6.2	58.9 ± 9.6		
<i>S.aureus</i>	85.9 ± 0.8 <sup>b</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>		
<i>S.capitis</i> S	99.0 ± 1.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0		
<i>S.capitis</i> 41	26.3 ± 5.5 <sup>b</sup>	73.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	66.5 ± 3.2 <sup>a</sup>		

<sup>a,b</sup>:各植物抽出液の抗菌液濃度間での有意差を意味する( $p < 0.05$ )

液 (× 1) :22.0mg/ml、10 倍 (× 10) :2.20mg/ml、50 倍 (× 50) :0.44mg/ml、100 倍 (× 100) :0.22mg/ml であった。

その結果、供試菌液  $10^{-3}$  の場合に、緑茶抗菌液× 1 で、全ての菌株に対して阻止円が形成された。しかし、キク葉では、いずれの菌株に対しても、阻止円が形成されなかった。キク葉には、抗菌試験に用いた菌株に対して、生育を阻止する成分が含まれていない、あるいは含まれていても含有量が少なく阻止するまでには至らなかった、または生育を促進する成分が含まれている事が考えられる。

菌株ごとでは、*E.coli* において供試菌液  $10^{-3}$  で、フキ葉、緑茶ともに× 1 で阻止円が形成されたが、供試菌液  $10^{-2}$  の場合、フキ葉× 1 で阻止円が形成され、緑茶× 1 では形成されず、供試菌液  $10^{-1}$  では、フキ葉× 1 においても阻止円が形成されなくなった。したがって *E.coli* に対しては、緑茶よりフキ葉の抗菌効果がより高いことが明らかになった。次に、*S.aureus* では、供試菌液  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  のいずれにおいても、フキ葉、緑茶× 1 で阻止円が形成された。また、フキ葉に比較して、緑茶で有意に大きな阻止円が形成された。このことから、*S.aureus* に対しては、フキ葉より、緑茶の抗菌効果が高いことが示された。また、*S.capitis* S に対しては、いずれの供試菌液でも高い抗菌効果が認められた。供試菌液  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  では、フキ葉は×

50、緑茶は× 100 まで阻止円が形成された。他の菌株に比べても抗菌液× 1 で顕著に大きい阻止円が確認されたことから、*S.capitis* S に対する、フキ葉、緑茶の抗菌効果は非常に高いといえる。しかし、同種の細菌にもかかわらず、*S.capitis* 41 に対しては、緑茶× 1 で阻止円が形成されたのみで、*S.capitis* S と比較すると抗菌効果は低くなった。

以上の結果から、*E.coli*、*S.aureus* に対して菌の生育を阻止するためには、フキ葉、緑茶ともに総ポリフェノール量が 22.0mg/ml 程度は必要であることが示された。また、*S.capitis* S に対しては、フキ葉では 0.44mg/ml、緑茶では 0.22mg/ml 必要であることが示された。なお、ディスク拡散法で、キク葉抽出液に抗菌効果が認められなかったことから、以降の抗菌試験と手指の洗浄には、フキ葉、緑茶のみを用いた。

## 2) 抗菌試験 希釈平板法

希釈平板法による抗菌試験の結果を、表 4 に示した。なお、抗菌液培地の総ポリフェノール量はフキ葉、緑茶ともに 1% 培地では 0.1mg/ml、10% 培地では 1.0mg/ml であった。また飲用濃度培地では、フキ葉は 0.47mg/ml、緑茶は 1.50mg/ml であった。培地に供試菌を接種、培養し、コロニー数を抗菌液培地と対照培地（抗菌液 0% 培地）で比較することにより、抗菌液による細菌の増殖抑制率を算出し、抗菌効果を検討した。

表5 手洗いにおける ATP 減少率の比較

(n=9)

	ATP量(RLU)		減少率(%)
	洗浄前	洗浄後	
基準値	1500以下		
常法	7234 ± 1499	420 ± 193	93.5 ± 2.1
フキ葉(10%濃度)	3739 ± 647	253 ± 57	90.4 ± 3.7
フキ葉(飲用濃度)	3203 ± 626	148 ± 30	93.9 ± 2.0
緑茶(10%濃度)	7495 ± 1636	1454 ± 402	77.1 ± 3.5
緑茶(飲用濃度)	4118 ± 1205	1081 ± 282	67.8 ± 8.3

その結果、いずれの菌株に対しても、フキ葉、緑茶ともに増殖抑制効果があることが明らかになった。また、総ポリフェノール量が高いほど増殖抑制効果が高くなる傾向がみられた。フキ葉では、*E.coli* に対し、1% 培地および飲用濃度培地に比較して、10% 培地で有意に増殖抑制率が高くなった。*S.aureus*、*S.capitis* S に対しては 1% 培地に比較して、10% 培地、飲用濃度培地で有意に高くなった。緑茶においては、*S.aureus*、*S.capitis* 41 に対して、1% 培地に比較して、10% 培地および飲用濃度培地で有意に増殖抑制率が高くなった。

菌株ごとでは、*S.aureus*、*S.capitis* S に対して、フキ葉、緑茶ともに 10% 培地、飲用濃度培地で増殖抑制率 100% を示した。したがって *S.aureus*、*S.capitis* S に対して、総ポリフェノール量がフキ葉は 0.47mg/ml、緑茶は 1.0mg/ml 以上で、完全に細菌増殖を抑制できることが明らかになった。また、(3) 1) のディスク拡散法による抗菌試験結果においても高い抗菌効果が得られたことから、フキ葉、緑茶は *S.capitis* S に対して、非常に高い抗菌効果があることが示唆された。しかし、(3) 1) と同様に手指から分離した *S.capitis* 41 に対しては、*S.capitis* S と比較すると増殖抑制効果は低くなった。原因として、分離した *S.capitis* は 18 種あり、生化学反応が異なる株も含まれることが考えられる。そのため、再度詳細に抗菌試験を行い、特徴を検証する必要があるといえる。

以上の結果から、フキ葉、緑茶抽出液には抗菌効果があることが明らかになった。その抗菌効果は、ポリフェノール含量が多いほど高くなる傾向が認められた。特に、手洗いが不十分であることが食中毒発生の要因となりやすい黄色

ブドウ球菌 *S.aureus* に対しては、十分な抗菌効果が得られた。したがって、フキ葉、緑茶ともに飲用濃度の抽出液を洗浄剤として活用することが可能であるといえる。

#### (4) 手指に対する洗浄・消毒効果

フキ葉、緑茶抽出液の手指に対する洗浄・消毒効果を検討するため、フキ葉、緑茶抽出液で手洗いを行い、ATP 拭き取り検査法により衛生検査を行った。その結果を表5に示した。なお、ATP 量は RLU (Relative Light Unit 相対発光量) で示した。ATP 拭き取り検査法は、調理器具や手指等に残存した細菌や食物残渣に含まれる ATP、AMP 量を測定し、汚れの量として評価する方法である。器具や技術、培養などに時間を要する細菌培養法とは異なり、簡便で短時間に判定できることから、近年、給食施設で多く用いられるようになっている<sup>16)</sup>。本実験には、(3) 2) で高い抗菌効果が認められたフキ葉、緑茶抽出液の 10% 濃度、飲用濃度抗菌液を用いた。

その結果、いずれの洗浄方法においても基準値 1500RLU を下回った。したがって、フキ葉、緑茶には薬剤石けんと同等の、十分な洗浄・消毒効果があることが示された。

表5の ATP 減少率より、フキ葉抽出液での手洗いでは、石けんを用いた常法との差がみられなかったが、緑茶抽出液では常法、フキ葉と比較して ATP 減少率が低い結果となった。そこで、手洗い前後の ATP 量と細菌数の変化を検証した(データ未発表)。その結果、緑茶洗浄後の ATP 量は基準値の 1500RLU 以下にならなかったにもかかわらず、細菌数は常法洗浄後の細菌数との間に有意差は認められず、常法と同様に減少した。このことから、緑茶に含まれ



るポリフェノール類等が手指に付着し、それらが細菌の ATP と合わせて汚れとして測定され得ることが考えられた。さらにカテキンを含む紅茶の飲用濃度抽出液を用いて同様の手洗い実験を行った結果、ATP 減少率は緑茶よりも紅茶で高くなる傾向にあった。しかし、常法やフキ葉抽出液の減少率には及ばない結果となった。これは、紅茶のカテキン含量 (8.61%<sup>17)</sup>) が、緑茶カテキン含量 (約 13 ~ 14%) に比較して少ないことが影響したものと考えられた。カテキン含量が少ないため、ATP 量として測定され得る手への付着量が少なくなったため、減少率が高くなったと推測される。しかし、紅茶においても減少率が常法には及ばなかったことから、カテキンを含むお茶を用いて手洗いをした場合、ATP 測定では正確にその洗浄度が測定できないといえる。したがって、茶を手洗いに用いる場合は、ATP 拭き取り検査法以外の、細菌培養法などの衛生検査の併用が必要であることが示された。

### 結語

給食調理では、食中毒などの健康危害を防ぐために頻回に手洗いが行われる。手洗い用の洗浄剤に、薬剤石けんではなく、天然植物成分が活用可能であれば、人体や環境にとって、より安全で安心な調理作業が可能になるのではないかと考えた。本研究では、資源の有効活用の点から、廃棄されることの多いキク葉、フキ葉と、抗菌効果が多く報告されている緑茶を試料とし、これら抽出液の細菌（手指からの分離菌と食中毒菌）に対する抗菌効果を検討し、手指用洗浄剤としての可能性を見出すことを目的とした。

その結果、ディスク拡散法によりフキ葉、緑茶で抗菌効果が認められた。*E.coli*、*S.aureus* に対して、菌の生育を阻止するためには、フキ葉、緑茶ともに総ポリフェノール量が 22.0mg/ml 程度は必要であることがわかった。また、*S.capitis* S に対しては、フキ葉では 0.44mg/ml、緑茶では 0.22mg/ml 必要であることがわかった。

また、希釈平板法から総ポリフェノール量が高いほど増殖抑制効果が高くなる傾向がみられた。*S.aureus*、*S.capitis* S に対しては、フキ葉で

は 0.47mg/ml、緑茶では 1.0mg/ml 以上で、完全に細菌増殖を抑制できることが明らかになった。

さらに ATP 拭き取り検査法により、フキ葉、緑茶の洗浄・消毒効果を検討した結果、フキ葉、緑茶ともに飲用濃度および 10% 濃度で基準値 1500RLU を下回った。フキ葉、緑茶は薬剤石けんと同等の洗浄・消毒効果があることが示された。

以上の結果から、フキ葉、緑茶は、飲用抽出液で手指の洗浄剤として用いることが可能であることが示唆された。しかし、緑茶では正確な ATP 測定が難しいため、ATP 拭き取り検査法以外の細菌培養法などの衛生検査を併用する必要があるといえる。

### 謝辞

キク葉を提供していただきました新潟市南区本間正満様に厚く御礼申し上げます。

### 文献

- 1) 鈴木久乃、太田和枝、殿塚婦美子. 給食管理. 東京: 第一出版、2010;p.148-50.
- 2) 厚生労働省. 大量調理施設衛生管理マニュアル. 平成 25 年 10 月 22 日付 (食安発 1022 第 10 号).
- 3) 厚生労働省大臣官房統計調査部. 食中毒統計. 1985-2013.
- 4) 鹿野健治. 食中毒等事件例 (平成 15 年前期) 2. 学校給食のパンによる SRSV 食中毒. 食品衛生学雑誌 2004;vol.45:157-58.
- 5) 文部科学省. 学校給食調理現場における手洗いマニュアル.
- 6) 西田博. 手洗いのバイブル第 4 版. 東京: 光琳、1997;p.162-63.
- 7) 西川武志、小松奈津美、岡安多香子ほか. 茶およびカテキン含有飲料の病原性大腸菌に対する増殖抑制効果の検討. 腸内細菌 2006;vol.20:321-27.
- 8) 原征彦、石上正. 茶ポリフェノール類の食中毒細菌に対する抗菌活性. 日食工誌 1989;vol.36:996-99.
- 9) 浦部貴美子、北尾幸子、香山佳代子ほか. 野草抽出物による *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

- aureus*, 及び *Bacillus subtilis* の生育抑制. 日食科工誌 2003;vol.50:350-55.
- 10) 田村朝子、田渕三保子、山田則子. ウコギ (*Acanthopanax sieblianum*) の抗菌性およびカット野菜に対する効果. 家政誌 2005;vol.56:451-56.
- 11) 牧野富太郎. 原色牧野植物大図鑑続編. 東京:北隆館、1983;p.211.
- 12) 渡辺 悟、田崎弘之、三沢尚子、佐藤和枝、坂上 宏. フキノール酸のラジカル消去能について. 聖徳栄養短期大学紀要 2004;No.35:8-13.
- 13) 杉田浩一、田島 眞、平 宏和、安井明美. 日本食品大事典 第2版. 東京:医師薬出版、2008;p.635-37.
- 14) 山田則子、田村朝子、田渕三保子. ウコギの成分特性と抗酸化能. 山形県立米沢女子短期大学紀要 2006;No.38:1-6.
- 15) 藤江歩巳、久保田真紀、梅村芳樹ほか. 新鮮ハーブのビタミンC量,DPPH ラジカル捕捉活性およびポリフェノール量. 調理科学 2001;vol.34:380-89.
- 16) 伊藤武. 新しい衛生管理法 ATP ふき取り検査 改定増補版. 名古屋:鶏卵肉情報センター、2009;p.7-11.
- 17) 高野實、谷本陽蔵、富田勲ほか. 緑茶の事典. 東京:柴田書店、2000;p.318-19.

## ABSTRACT

### Antibacterial effects of the plant extracts against bacteria isolated from fingers

Sakura Oyama<sup>1\*</sup>, Tomomi Tsuji<sup>1\*</sup>, Tadasato Nagano<sup>1</sup>, Asako Tamura<sup>1\*</sup>

(\* These authors equally contributed to this article)

<sup>1</sup> Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life Studies, University of Niigata Prefecture

\* Correspondence, asako-t@unii.ac.jp

In order to discover the usability of plant extracts as hand-washing agents, their antibacterial effects against bacteria (those isolated from fingers as well as bacteria associated with food poisoning) were investigated by using the following samples: chrysanthemum leaves and Japanese butterbur leaves, which are often discarded; and green tea, the antibacterial effect of which is frequently reported.

Regarding any plant extract, the total amount of polyphenols tended to increase as the temperature of the extract increased. The average count of bacteria isolated from fingers turned out to be the total bacteria count of  $5.1 \times 10^2$  (log/ml  $2.2 \pm 0.2$ ). The antibacterial test was conducted on the extracts of chrysanthemum leaves, Japanese butterbur leaves and green tea in order to investigate the effects against bacteria isolated from fingers (*Staphylococcus capitis* 41) and the standard food-poisoning strains of *Escherichia coli* (*E.coli*), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) and *Staphylococcus capitis subsp.capitis* (*S.capitis* S). It was discovered that in order to inhibit the growth of *E.coli* and *S.aureus*, the total polyphenols are required at least 22.0 mg/ml for both Japanese butterbur leaf and green-tea extract. It was also revealed that in order to inhibit the growth of *S.capitis* S, polyphenols are required 0.44 mg/ml for the Japanese butterbur leaf extract and 0.22 mg/ml for the green-tea extract. Moreover, it was revealed that both Japanese butterbur leaf and green-tea extract have growth-inhibition effect against all the strains. It was discovered that 0.47 mg/ml or greater polyphenols of Japanese butterbur leaf extract and 1.0 mg/ml or greater polyphenols of green-tea extract can completely inhibit the growth of *S.aureus*

and *S.capitis* S. The cleansing and sterilization effects of Japanese butterbur leaf and green-tea extract were investigated through the AIP smear test. The result showed that neither extract reached the standard value of 1500RLU at the concentrations of drinking level and 10%.

These findings indicate that it is possible to use Japanese butterbur leaf and green-tea extract as hand-washing agents at the drinking-level concentration.

Key Words: Japanese butterbur leaves, green tea, polyphenols, antibacterial effect, ATP